

УДК 577.113:579.254:582.232

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ УСТОЙЧИВОСТИ К МЕНАДИОНУ У ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803***М.Е. Семина¹, Е.Д. Абраменко¹, Е.М. Муронец¹,
Ю.В. Титаева¹, К.Н. Тимофеев², И.В. Еланская¹***(¹кафедра генетики, ²кафедра биофизики биологического факультета МГУ)*

Тилакоидные мембраны цианобактерий содержат как фотосинтетическую, так и дыхательную электрон-транспортные цепи (ЭТЦ), причем мембранный пул пластохинона (PQ) и комплекс цитохромов *b₆f* (сyt *b₆f*) являются общими компонентами для систем дыхательного и фотосинтетического переноса электронов (Vermaas, 1996). Мощным инструментом при изучении механизмов функционирования ЭТЦ у фототрофных организмов является использование ингибиторов электронного транспорта. Ингибиторы хинонного типа, такие как менадион, плюмбагин, дибромотимохинон, дуροхинон, взаимодействуют с ЭТЦ цианобактерий на уровне пула PQ и комплекса cyt *b₆f* и могут влиять на транспорт электронов как в фотосинтетической, так и в дыхательной цепи. Ингибирующее действие хинонов обусловлено главным образом их одноэлектронным восстановлением до семихинона, который в свою очередь может взаимодействовать с молекулярным кислородом с образованием супероксида, индуцирующего окислительный стресс (Hassan, Fridovich, 1979). При восстановлении хинонов по двухэлектронному механизму образуется гидрохинон, который взаимодействует с глюкуроновой кислотой с образованием нетоксичных конъюгатов (Lind et al., 1982). В клетках цианобактерий менадион может восстанавливаться дегидрогеназами NDH-1 и NDH-2, а также сукцинатдегидрогеназой (SDH), которые вовлечены в транспорт электронов в тилакоидной мембране (Howitt et al., 1999; Cooley, Vermaas, 2001). Менадиол (менадион, восстановленный до гидрохинона) взаимодействует с пулом пластохинона и вовлекается в циклический транспорт электронов с участием фотосистемы I (PS I) (Hauska et al., 1974).

В клетках млекопитающих эффективная защита от токсичного действия экзогенных хинонов осуществляется с участием флавиносодержащего фермента NAD(P)H: хинон-оксидоредуктазы (ДТ-диафоразы), которая восстанавливает хиноны по двух-

электронному механизму, препятствуя их взаимодействию с другими ферментами, приводящему к образованию семихинона (Prochaska et al., 1985). Мутанты мышей с инактивированным геном, кодирующим ДТ-диафорузу, чрезвычайно чувствительны к инъекциям менадиона по сравнению с особями дикого типа (Radjendirane et al., 1998).

В клетках цианобактерии *Synechocystis* sp. штамм PCC 6803 (далее — *Synechocystis* 6803) обнаружена растворимая NAD(P)H: хинон-оксидоредуктаза (NQR), кодируемая геном *drgA* (Чеснавичене и др., 1994; Elanskaya et al., 1998), которая использует NADPH и NADH в качестве доноров электронов, а наиболее предпочтительным акцептором для этого фермента являются производные хинонов (Matsuo et al., 1998). Подобно ДТ-диафоре млекопитающих, NQR *Synechocystis* 6803 осуществляет биоактивацию нитроароматических соединений (Elanskaya et al., 1998), а мутанты по гену *drgA* отличаются повышенной чувствительностью к ингибиторам хинонного типа — менадиону и плюмбагину (Еланская и др., 2004а).

Данная работа посвящена изучению роли NQR, кодируемой геном *drgA*, а также дегидрогеназ NDH-1, NDH-2 и SDH в устойчивости клеток *Synechocystis* 6803 к менадиону.

Методы исследования

В работе использовали штамм дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803 и мутант, несущий инсерцию гена канамицинрезистентности в *BamHI*-сайте гена *drgA* (Чеснавичене и др., 1994), из коллекции кафедры генетики МГУ. Инсерционный мутант по гену, кодирующему NdhB-субъединицу комплекса NDH-1, получен от проф. Т. Огавы (Ogawa, 1991). Мутанты, лишенные функционально активных дегидрогеназ NDH-2 (Howitt et al., 1999) и SDH (Cooley et al., 2000), а также мутант Oх, лишенный хинол- и цитохромоксидаз (Howitt, Vermaas, 1998) получены от проф. В. Вермааса. Бактериологически чистые культуры цианобактерий выращивали при

* Принятые сокращения. Диносеб — 2-сек-бутил-4,6-динитрофенол; менадион — 2-метил-1,4-нафтохинон; плюмбагин — 5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтохинон; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; cyt *b₆f* — цитохром *b₆f*; DCMU — 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина; FNR — ферредоксин:NADP⁺-оксидоредуктаза; MTT — 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолийбромид; NDH-1 — NAD(P)H-дегидрогеназа (комплекс I); NDH-2 — NADH-дегидрогеназа; NQR — NAD(P)H:хинон-оксидоредуктаза; PS — фотосистема; PQ — пластохинон.

30° при постоянном освещении $40 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в жидкой минеральной среде BG-11 (Rippka et al., 1979). Культуры мутантов выращивали в присутствии соответствующих антибиотиков. Трансформацию цианобактерий проводили по методу (Grigorieva, Schestakov, 1982).

Методы анализа МТТ-редуктазной активности и ЭПР-спектроскопии описаны ранее (Еланская и др., 2004б). Экспрессию гена *drgA* изучали методом обратной транскрипции в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) (Еланская и др., 2002). В реакции обратной транскрипции использовали праймер *drgA*-Rev: 5'-ATGGGACAGCTATCATAG. Для ПЦР использовали тот же праймер в сочетании с *drgA*-Fw: 5'-GAAGAAAGAAAGTTGCTC.

Результаты и их обсуждение

Сравнение устойчивости к менадиону клеток дикого типа и мутантов цианобактерии с нарушением отдельных компонентов электрон-транспортной цепи (таблица) показало, что мутант, лишенный комплекса NDH-1, а также мутант по гену *drgA*, лишенный NQR, отличаются повышенной чувствительностью к менадиону. Мутанты с нарушением дегидрогеназы NDH-2, сукцинатдегидрогеназы, а также мутант, лишенный хинол- и цитохромоксидаз (Ox), по устойчивости к менадиону очень слабо отличались от клеток дикого типа.

Устойчивость клеток дикого типа и мутантов к менадиону на твердой среде в фотоавтотрофных условиях

Штамм	Ингибирующая концентрация менадиона (мкг/мл)
Дикий тип	4
NQR	1,5
NDH-1	1,5
SDH	3,5
NDH-2	3,5
Ox	3,5
NDH-1/NQR	1,5
NDH-2/NQR	1,5
Ox/NQR	1,5

С целью введения дополнительной мутации по *drgA* клетки мутантов по NDH-1, NDH-2, SDH и Ox трансформировали рекомбинантными плазмидами, несущими мутантный ген *drgA*. В результате трансформации были отобраны полностью сегрегированные мутанты: NDH-1/NQR, NDH-2/NQR и Ox/NQR. Получить полностью сегрегированный мутант SDH/NQR не удалось, т.е. присутствие хотя бы одного из этих белков

необходимо для поддержания роста клеток цианобактерии в фотоавтотрофных условиях. Двойные мутанты NDH-1/NQR, NDH-2/NQR и Ox/NQR отличались высокой чувствительностью к менадиону (таблица).

С помощью ЭПР-спектроскопии было изучено влияние менадиона и менадиола (менадиона, восстановленного дитионитом) на кинетику восстановления реакционного центра PS I ($P700^+$) после его фотоокисления белым светом в присутствии DCMU в клетках дикого типа и мутантов по NDH-1 и NQR. При добавлении менадиона скорость послесветового восстановления $P700^+$ в клетках дикого типа и мутанта по NDH-1 возрастала, тогда как у мутанта по NQR восстановление $P700^+$ сильно замедлялось. В присутствии менадиола восстановление $P700^+$ ускорялось как в клетках дикого типа, так и у мутантов по NDH-1 и NQR (рис. 1). Полученные данные позволяют предположить, что NQR защищает клетки цианобактерии от токсического действия экзогенных хинонов, восстанавливая их до гидрохинонов, тогда как в отсутствие NDH-1 токсический эффект менадиона может быть связан с нарушением дыхательного и циклического

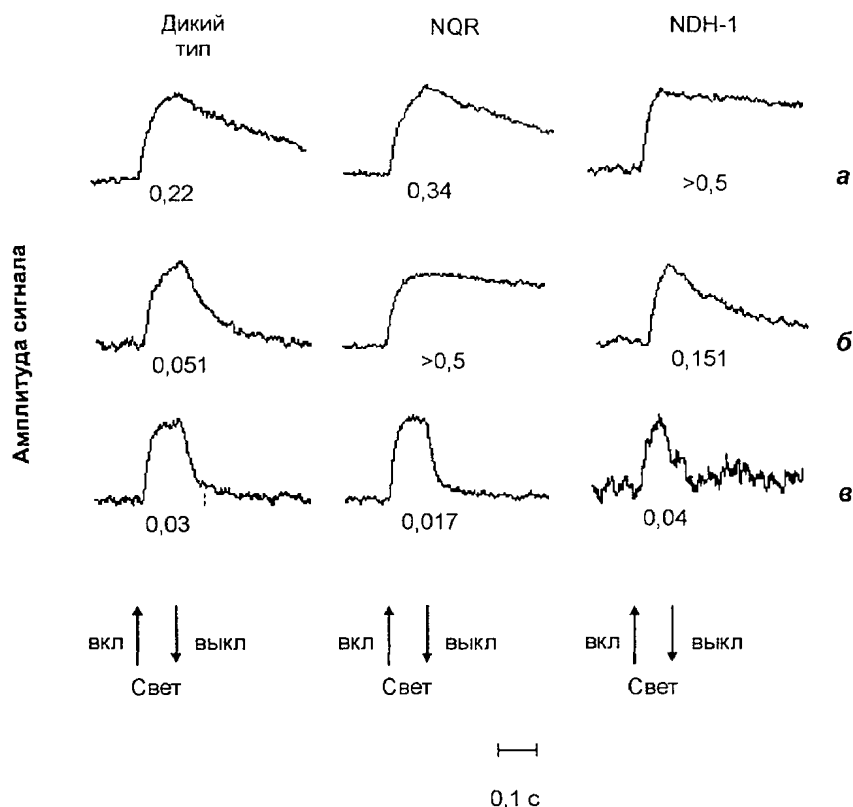


Рис. 1. Реакции окисления-восстановления $P700$, зарегистрированные методом ЭПР-спектроскопии в фотоавтотрофно выращенных клетках дикого типа и мутантов по NQR и NDH-1 в присутствии 20 мкМ DCMU:

а — контроль; б — в присутствии 20 мкМ менадиола, в — в присутствии 20 мкМ менадиола. ЭПР сигнал генерировали импульсным освещением (0,1 с) суспензии клеток белым светом ($2000 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Условия ЭПР: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции 0,3 мТ, частота модуляции 100 кГц, постоянная времени 10 мкс. Стрелки указывают моменты включения (вкл) и выключения (выкл) света. Цифры под кривыми соответствуют времени полувосстановления сигнала от $P700^+$ ($t_{1/2}$, с)

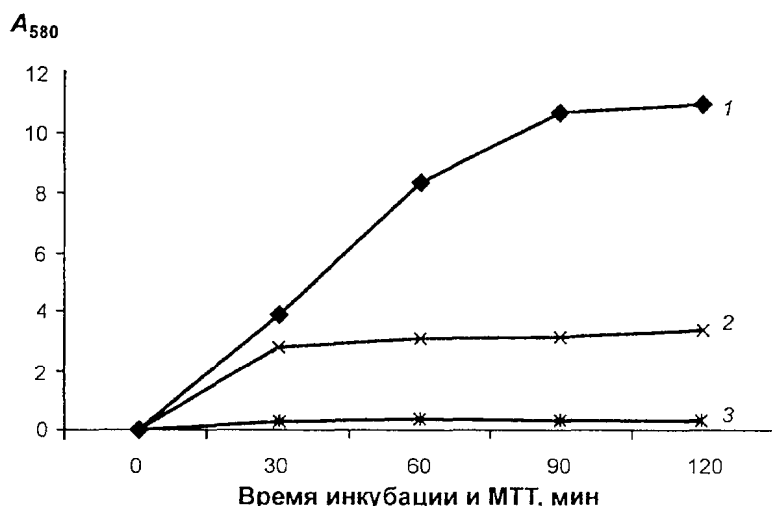


Рис. 2. Восстановление МТТ на свету фотоавтотрофно выращенными клетками дикого типа (1) и мутантов по NQR (2) и NDH-1 (3)

транспорта электронов через PS I (Mi et al., 1992; 1995).

Поскольку NDH-1 и NQR участвуют в окислении NADPH, был проведен сравнительный анализ дегидрогеназной активности в клетках дикого типа и мутантов по NDH-1 и NQR. О дегидрогеназной активности клеток или изолированных митохондрий можно судить по их способности восстанавливать соли тетразолия (например, МТТ) до формазана (Riley, Workman, 1992). В фотоавтотрофных условиях роста скорость восстановления МТТ в клетках дикого типа была существенно выше, чем в клетках мутанта по NQR, тогда как у мутанта по NDH-1 МТТ-редуктазная активность практически отсутствовала (рис. 2). Таким образом, восстановление МТТ до формазана в фотоавтотрофно выращенных клетках *Synechocystis* 6803 осуществляется с участием комплекса NDH-1. Кроме того, значительная доля суммарной дегидрогеназной активности в фотоавтотрофно выращенных клетках *Synechocystis* 6803 связана с функцией NQR, которая, по-видимому, функционирует в комплексе (или координированно) с NDH-1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в фотоавтотрофных условиях клетки мутантов по NDH-1 и NQR характеризуются сниженной способностью к окислению NADPH.

На рис. 3 приведены результаты анализа экспрессии гена *drgA* в клетках дикого типа, выросших в различных условиях. Ген *drgA* экспрессируется в фотоавтотрофных условиях роста (1) и практически не экспрессируется в клетках, инкубированных в темноте в течение 6 ч (3). Уровень

экспрессии *drgA* существенно возрастает в присутствии 5 мМ глюкозы как на свету (2), так и при инкубации клеток в темноте в присутствии глюкозы (4). Эти данные указывают на возможную связь между уровнем экспрессии *drgA* и содержанием NADPH в клетках цианобактерии и хорошо согласуются с полученными ранее данными об участии продукта *drgA* в окислении NADPH (Еланская и др., 2004б). Инкубация клеток на свету в присутствии менадиона или нитрофенольного гербицида диносеба не вызывала индукции экспрессии *drgA* (5, 6).

Токсическое действие менадиона обычно связывают с окислительным стрессом, который возникает в результате образования супероксида в ходе циклических реакций одноэлектронного окисления-восстановления хинонов (Thor et al., 1982). Полученные результаты свидетельствуют о том, что устойчивость к менадиону фотоавтотрофно растущих клеток *Sy-*

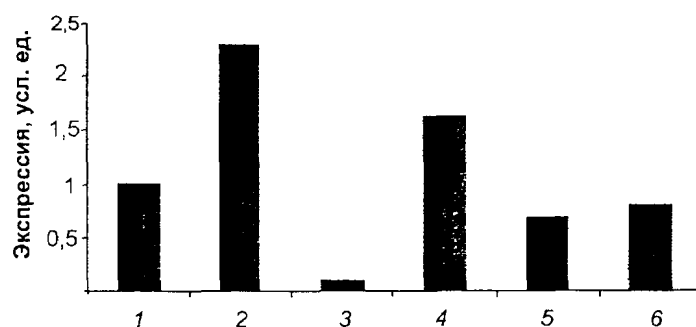


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии гена *drgA* в разных условиях роста по результатам ОТ-ПЦР. Суммарная РНК выделена из фотоавтотрофно выращенных клеток (1) и клеток, инкубированных в течение 6 ч на свету с 10 мМ глюкозы (2), в темноте без глюкозы (3), в темноте с 10 мМ глюкозы (4), на свету с 5 мМ менадиона (5) и на свету с 5 мМ диносеба (6)

nechocystis 6803 связана со способностью NQR эффективно восстанавливать экзогенные хиноны до гидрохинонов, а также с функцией дегидрогеназного комплекса NDH-1, который участвует в циклическом фотосинтетическом транспорте электронов через ФС I.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48658-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Еланская И. В., Гривенникова В. Г., Грошев В. В., Кузнецова Г. В., Семин М. Е., Тимофеев К. Н. 2004а. Роль NAD(P)H:

хинон-оксидоредуктазы, кодируемой геном *drgA*, в восстановлении экзогенных хинонов в клетках цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Биохимия. 69. 172–178.

Еланская И.В., Карандашова И.В., Богачев А.В., Хагеманн М. 2002. Функциональный анализ генов, кодирующих Na^+/H^+ -антипортеры у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Биохимия. **67**. 518–528.

Еланская И.В., Тимофеев К.Н., Гривенникова В.Г., Кузнецова Г.В., Давлетшина Л.Н., Лукашев Е.П., Яминский Ф.В. 2004б. Восстановление реакционного центра фотосистемы I у DrgA-мутанта цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, лишённого растворимой NAD(P)H:хинон-оксидоредуктазы // Биохимия. **69**. 549–559.

Чеснавичене Э.А., Еланская И.В., Барцевич В.В., Шестаков С.В. 1994. Молекулярный анализ нового гена, контролирующего устойчивость цианобактерии *Synechocystis* 6803 к метронидазолу и нитрофенольным гербицидам // Докл. РАН. **334**. 657–659.

Cooley J.W., Howitt C.A., Vermaas W.F.J. 2000. Succinate:quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport // J. Bacteriol. **182**. 714–722.

Cooley J.W., Vermaas W.F.J. 2001. Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. PCC 6803: capacity comparisons and physiological function // J. Bacteriol. **183**. 4251–4258.

Elanskaya I.V., Chesnavichene E.A., Vernotte C., Astier C. 1998. Resistance to nitrophenolic herbicides and metronidazole in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a result of the inactivation of a nitroreductase-like protein encoded by *drgA* gene // FEBS Letters. **428**. 188–192.

Grigorieva G., Shestakov S. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // FEMS Microbiol. Lett. **13**. 367–370.

Hassan H.M., Fridovich I. 1979. Intracellular Production of Superoxide Radical and of Hydrogen Peroxide by Redox Active Compounds // Arch. Biochem. Biophys. **196**. 385–395.

Hauska G., Reimer S., Trebst A. 1974. Native and artificial energy-conserving sites in cyclic photophosphorylation systems // Biochim. Biophys. Acta. **357**. 1–13.

Howitt C.A., Vermaas W.F.J. 1998. Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Biochemistry. **37**. 17944–17951.

Howitt C.A., Udall P.K., Vermaas W.F.G. 1999. Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration // J. Bacteriol. **181**. 3994–4003.

Lind C., Hochstein P., Ernster L. 1982. DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation // Arch. Biochem. Biophys. **216**. 178–185.

Matsuo M., Endo T., Asada K. 1998. Isolation of a novel NAD(P)H-quinine oxidoreductase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 // Plant Cell Physiol. **39**. 751–755.

Mi H., Endo T., Ogawa T., Asada K. 1995. Thylakoid membrane-bound, NADPH-specific pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Plant Cell Physiol. **36**. 661–668.

Mi H., Endo T., Schreiber U., Ogawa T., Asada K. 1992. Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 // Plant Cell Physiol. **33**. 1233–1237.

Ogawa T. 1991. A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC 6803 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**. 4275–4279.

Prochaska H.J., De Long M.J., Talalay P. 1985. On the mechanism of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**. 8232–8236.

Radjendirane V., Joseph P., Lee Y., Kimura S., Klein-Szanto A.J.P., Gonzales F.J., Jaiswal A.K. 1998. Disruption of the DT diaphorase (*NQO1*) gene in mice leads to increased menadione toxicity // J. Biol. Chem. **273**. 7382–7389.

Riley R.J., Workman P. 1992. Enzymology of the reduction of the potent benzotriazine-di-N-oxide hypoxic cell cytotoxin SR 4233 (WIN 59075) by NAD(P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase (EC 1.6.99.2) purified from Walker 256 rat tumor cells // Biochem Pharmacol. **43**. 167–174.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. **111**. 1–61.

Thor H., Smith M. T., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S., Orrenius S. 1982. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells // J. Biol. Chem. **257**. 12419–12425.

Vermaas W. 1996. Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: principles and possible biotechnology applications // J. Applied Phycology. **8**. 263–273.

MOLECULAR MECHANISM OF MENADIONE RESISTANCE IN THE CYANOBACTERIUM *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

M.E. Semina, E.D. Abramenko, E.M. Muronetz,
Yu.V. Titaeva, K.N. Timofeev, I.V. Elanskaya

The effect of mutations in genes encoding dehydrogenases and oxidases on the resistance of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to oxidative stress inducer menadione was studied. Enhanced sensitivity to menadione was observed in the mutants carrying insertions in *drgA* gene

encoding NAD(P)H: quinone-oxidoreductase (NQR) and in *ndhB* gene encoding the subunit of NDH-1 complex. Menadione resistance in the mutants lacking oxidases (Ox), succinate-dehydrogenase (SDH), and NDH-2 dehydrogenase was the same as in wild type cells. The additional mutation in *drgA* gene increased sensitivity to menadione in NDH-2 and Ox mutants. Double mutant lacking both of SDH and NQR was not viable. Expression of *drgA* gene decreased during cell incubation in the dark but increased in the presence of glucose both in the dark and in the light. Under photoautotrophic growth conditions dehydrogenase activity of the cells depends mainly of the NQR and NDH-I functions. The rate of photosystem I reaction center (P700⁺) re-reduction after its oxidation with white light in the presence of DCMU increased in wild type and NDH-1 mutant after addition of menadione, whereas it decreased in NQR mutant. In the presence of menadiol the reduction of P700⁺ was accelerated in all strains studied. These data allow suggesting that NQR provides the defense of cyanobacterial cells from the toxic effect of menadione by its 2-electron reduction to menadiol. Increased sensitivity to menadione of NDH-1 mutant may results from the inhibition of respiration and cyclic electron transport around photosystem I.